

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 善積 哲也

横浜市立大学大学院医学研究科 脳神経外科学

## 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 高橋 琢哉

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 中島 秀明

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 船越 健吾

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### Granulocyte Colony-Stimulating Factor Improves Motor Function In Rat Developing Compression Myelopathy

圧迫性脊髄症モデルラットに対する顆粒球コロニー刺激因子の運動機能改善効果について

#### 【序論】

圧迫性脊髄症は、ヘルニア、骨棘、靱帯骨化などによる慢性的な脊髄圧迫により緩徐進行性の脊髄障害を来す疾患群である。一般的にある程度以上の脊髄症状を呈した場合には手術療法が最も信頼できる治療法である。一方で、圧迫性脊髄症に対して有効とされる保存的治療法の報告はいまだなされていない。

顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony stimulating factor, 以下 G-CSF) は、血球系に作用する増殖因子であり、顆粒球系細胞の分化・増殖・生存促進などの作用を有する。最近では、G-CSF の神経保護作用が注目されており、特に急性脊髄損傷に対する有効性がいくつか報告されている。

そこで、我々はラットの圧迫性脊髄症モデルに G-CSF を投与することによって、慢性的な脊髄圧迫により生じた脊髄症に対する、G-CSF の運動機能に及ぼす効果と治療薬としての可能性を検討した。

#### 【実験材料と方法】

1) 予防実験 : Wistar rat(雄, 250g-290g)の C5-6 椎弓下に吸水膨張性ポリマーを留置することで圧迫性脊髄症モデルを作成した。このモデルはポリマー留置直後は全く症状を呈さないが、術後数週間の潜伏期間を経て運動機能の低下を認めてくるという、実際の臨床で見られる圧迫性脊髄症の臨床経過に極めて酷似している。また、ポリマーを挿入後留置せずに直ちに抜去する偽手術群も作成した。術後直ちに G-CSF 15 $\mu$ g/kg または生理食塩水を毎週 5 日間皮下注射にて投与を行い、以下のように振り分けた。

Group A : 偽手術+生理食塩水皮下投与 (n=12) (偽手術群)。

Group B : 圧迫性脊髄症モデル+生理食塩水皮下投与 (control 群) (n=12)。

Group C : 圧迫性脊髄症モデル+G-CSF 15 $\mu$ g+生理食塩水皮下投与 (G-CSF 投与群) (n=12)。  
頸髄圧迫導入後 26 週間後までロータローッド持続歩行時間と前肢握力を毎週測定した。

術後 26 週目に還流固定を行い、摘出頸髄の C5-6 レベルの 1mm 長にわたるスライス長 5 $\mu$ m の標本を作成し、5 $\mu$ m 間隔の合計 100 枚のスライドから脊髄前角細胞数を測定した。

さらに、新たに 18 匹のラットを上記と同様に Group A (n=6), B (n=6), C (n=6) に振り分け、これらを 8 週間目で還流固定を行い、摘出頸髄の C5-6 レベルの 5 $\mu$ m 厚、50 $\mu$ m 毎の 3 枚のスライド標本を作成し、TUNEL 染色を行い、各群間で検出された TUNEL 陽性細胞数を比較し、アポトーシスによる細胞死を評価した。

2) 治療実験：圧迫性脊髄症モデルの作成，または偽手術を行い，予防実験と同様に合計 36 匹のラットを Group A (n=12), B (n=12), C (n=12)に振り分けた．術後 8 週目より G-CSF または生理食塩水の投与を開始し，頸髄圧迫導入後 26 週目まで運動機能（ローターロッド持続歩行時間，前肢握力）を測定し，さらに還流固定後，脊髄前角細胞数を測定し，各グループ間で比較した．

### 【結果】

#### 1), 予防実験

- ・ローターロッド持続歩行時間：Group A（偽手術群）では頸髄圧迫導入 26 週間後まで安定して健常走行可能であったが，Group B（control 群）では脊髄圧迫導入後 5 週目以降 26 週目まで Group A と比較して有意にローターロッド持続歩行時間が短縮した( $P<0.001$ )．対照的に Group C（G-CSF 投与群）では 26 週間を通して Group A と同等にローターロッド上での連続歩行が可能で，両群に明らかな有意差を認めなかった．

- ・前肢握力：頸髄圧迫導入 7 週後までは全グループが同等の前肢握力を示す．しかし Group B では術後 8 週目以降，A と比較して有意に前肢握力が低下する( $P<0.001$ )．一方で Group C は頸髄圧迫導入後から 26 週間を通して A と同等の前肢握力を維持した．

- ・脊髄前角細胞数：26 週後の 1mm にわたる C5-6 レベルの脊髄前角細胞数は Group A, B, C でそれぞれ  $492.6\pm10.4$ ,  $376.8\pm12.8$ ,  $478.6\pm7.7$  であり Group B が Group A と比較して脊髄前角細胞が有意に脱落していた ( $P<0.001$ ) が，Group C では A と同等に脊髄前角細胞が維持されていた．

- ・TUNEL 染色：術後 8 週目の時点の TUNEL 染色では，C5-6 レベルの脊髄前角における TUNEL 陽性細胞の占める割合が，Group A, B, C でそれぞれ  $8.2\pm5.1$ ,  $34.3\pm6.5$ ,  $13.5\pm5.8\%$  であり，Group B は A と C に比較して，TUNEL 陽性細胞の割合が高く，より多くのアポトーシスによる細胞死が生じていることが示唆された．

#### 2), 治療実験

- ・ローターロッド持続歩行時間：Group A のラットは 26 週間を通して，予防実験と同様に健常走行が可能であった．Group B と C では，持続歩行時間が術後 6 週目から Group A と比較して有意に短縮する( $P<0.05$ )．その後 Group B では，生理食塩水の投与を開始した 8 週目以降もローターロッド持続歩行時間は悪化し続けるが，8 週目から G-CSF の投与を開始した Group C では投与後 1 週間で，ローターロッド持続歩行時間の改善を認め，9 週から 12 週まで Group A と同等に歩行可能であった．Group C は術後 9 週から 15 週まで B よりも有意に長時間走行可能であったが( $P<0.05$ )，その後は徐々に歩行時間が短縮していく．

- ・前肢握力：予防実験と同様に 7 週後までは 3 グループが同等の前肢握力を示し，8 週の時点で，Group B, C は A と比較して有意な前肢握力の低下が生じる( $P<0.05$ )．それから，生理食塩水が投与された Group B では，その後も前肢筋力が低下するが，G-CSF が投与された Group C ではすぐに前肢握力の改善を認め翌週から 14 週目までの間，Group A と比較して有意差を認めない．その後は Group C でも徐々に前肢握力は低下するが，術後 9 週目

以降 26 週に至るまで常に C の前肢握力は B よりも有意に高値を示していた。

・脊髄前角細胞数：C5-6 レベルの脊髄前角細胞数は Group A, B, C でそれぞれ  $514 \pm 17.0$ ,  $386.2 \pm 14.0$ ,  $416.4 \pm 11.0$  で、Group B と C は A と比較して有意に脊髄前角細胞数の減少がみられた ( $P < 0.001$ )。Group B と C の間に脊髄前角細胞数に有意な差を認めなかったが ( $P = 0.142$ )、C は B よりもより脊髄前角細胞が温存されていた。

#### 【結論】

G-CSF はラットの圧迫性脊髄症モデルラットにおける運動機能低下と脊髄前角細胞の脱落を抑制し、さらにすでに脊髄症を発症した後でさえも一時的な運動機能の改善をもたらした。本研究は、G-CSF の慢性圧迫性脊髄症に対する治療薬としての可能性を示唆している。

論文要旨に続いて以下の質疑応答がなされた。

#### 中島副査による質問・コメント

1) 脊髄圧迫導入後 26 週間後の時点で、control 群は脊髄前角細胞が偽手術群や G-CSF 投与群と比較して脊髄前角細胞が 2 割程度減少しているが、この程度で運動機能の低下が生じるのは妥当か。

回答：圧迫性脊髄症モデルは後方から強い圧迫を受け、また圧迫が長期となると白質に脱髄を示唆する空泡変性が生じてくる。したがって圧迫性脊髄症モデルの運動機能の低下は脊髄前角細胞の脱落だけではなく、後索障害（深部感覚、位置覚）や錐体路障害も関与している可能性がある。

2) 圧迫性脊髄症モデルに G-CSF はどのように影響して、運動機能の維持や脊髄前角細胞の温存がなされているか。また治療実験において、脊髄圧迫導入後 8 週間目で G-CSF を投与することで運動機能が急激に改善するのはなぜか。

回答：本研究では、メカニズムを追究する実験は行わなかったが、過去の論文では G-CSF の神経保護効果としてアポトーシスの抑制や血管新生が報告されている。また脊髄症がすでに発症し、進行している脊髄圧迫導入後 8 週間目に G-CSF が投与されることで、運動機能が改善するメカニズムとしては、G-CSF により血管新生が起こり血流が改善し、血流が低下していても細胞死を免れていた神経細胞が機能を回復したのでは、と推測している。

4) 予防実験の途中で G-CSF の投与を中止したらどうなるか。

回答：脊髄圧迫が解除されているわけではないため、運動機能や脊髄前角細胞の維持効果はなくなると思われる。

最後に、中島副査より以下のコメントがあった。

G-CSF の神経保護作用は、実は直接的に細胞死を抑制するというのではなくて単に血流の影響だけをみている可能性は否定できない。もし G-CSF の神経保護効果が直接的に神経細胞死を抑制するものであれば、途中で投与を中止しても効果は持続し、血流改善などを介した間接効果であれば、すぐに効果がなくなるのではないか。

#### 船越副査からの質問・コメント

1) HE 染色で脊髄前角細胞数を数えているが、それが本当に脊髄前角細胞であるかをどのように判断したのか。

回答：過去の論文を参考に位置、細胞全体や核・核小体の大きさや形状、細胞質内に目立つ Nissl 小体などから判断した。

2) 予防実験で、TUNEL 染色をしているが、TUNEL 陽性細胞に神経細胞だけではなく神経膠細胞なども含まれているのか。

回答：NeuN や GFAP など多重染色を行っていないため、TUNEL の評価は神経細胞や神経膠細胞の両方が含まれている。

3) 前肢握力は週数毎に増加していくがこれは妥当か。

回答：体重も増加していくため妥当と考えている。

上記質疑応答に加え、船越副査より以下のコメントがあった。

・脊髄前角細胞を評価するのであれば CHAT で染色をすべきであった。また、HE 染色のみの評価だと、脊髄圧迫により前角細胞の形態が変化してくるとよけいに判別しにくくなるのではないか。

・圧迫性脊髄症モデルは肉眼的に後索が前角よりもつぶれておりダメージが大きいと考えられる。また齧歯類は、側索だけではなく後索にも主要な運動性の tract が通過していることも考慮すると、脊髄前角細胞だけで G-CSF の治療効果を説明可能とは思えない。錐体路障害は免疫組織化学で定量的に評価可能である。

## 高橋主査からのコメント

1) 治療に生かしていく上で最低限必要なストーリー，エビデンスがない．どのタイミングでどのように投与するか，治療戦略を考える上での，データが足りない．

2) 治療実験において，G-CSF 投与後に急激に運動機能の改善がみられる．その後，再度運動機能が低下してくるが，最終的には投与直前と同じレベルの運動機能を維持する．つまり治療効果は 2 相性を示し，①投与による急性期の効果および②投与後慢性期の効果からなると考えられる．予防実験では，G-CSF の投与により最初から投与開始後 26 週間運動機能が維持される，ことも踏まえると，G-CSF の神経保護効果は，血流による影響だけではなく，投与後慢性期においても細胞死を一定のレベルで抑制しているのではないか．

3) どの細胞がどのくらいやられているからどのくらいの機能低下が生じているのかという相関が実験結果として欲しい．細胞死が生じるときの細胞特異性や，介在ニューロンと脊髄前角細胞では圧迫性のストレスに対する抵抗性の違いがあるかなどについて実験をする必要がある．

4) 本当に血流が増加すれば，運動機能が改善するのか．

以上の質疑応答が行われた後，審査員による協議の結果，本研究は博士号（医学）の授与に値するものと判定された．